

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :

C12Q 1/37

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/13517

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum:

2. April 1998 (02.04.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/02204

(22) Internationales Anmeldedatum: 25. September 1997  
(25.09.97)(30) Prioritätsdaten:  
196 39 450.3 25. September 1996 (25.09.96) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):  
DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM  
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE];  
Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).  
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG  
[DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 150, D-69120 Heidelberg  
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEBATIN, Klaus-Michael  
[DE/DE]; Uferstrasse 22a, D-69120 Heidelberg (DE). LOS,  
Marek [PL/DE]; Obere Buttengasse 10, D-69121 Heidel-  
berg (DE). HUG, Hubert [DE/DE]; In der Neckarhelle 81-2,  
D-69118 Heidelberg (DE).(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger  
Strasse 246, D-81825 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,  
CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, SE).

## Veröffentlicht

*Mit internationalem Recherchenbericht.  
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen  
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen  
entreffen.*

(54) Title: METHOD FOR APOPTOSIS DIAGNOSIS IN CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM DIAGNOSTISCHEN NACHWEIS VON APOPTOSE IN ZELLEN

## (57) Abstract

The invention relates to a method for apoptosis diagnosis in cells wherein the cells are loaded with a substrate for ICE/Ced3 family proteases and the protease reaction of the substrate is monitored by imaging methods. The invention also concerns a kit in order to carry out this method.

## (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Apoptose in Zellen, wobei die Zellen mit einem Substrat für Proteasen der ICE/Ced3-Familie beladen werden und die Umsetzung des Substrats durch die Protease mittels bildgebender Methoden verfolgt wird. Ferner betrifft die Erfindung einen zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Kit.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Türkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NI	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Verfahren zum diagnostischen Nachweis von Apoptose in Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum diagnostischen Nachweis von Apoptose in Zellen und einen hierfür verwendbaren Kit.

Alle derzeitigen Methoden zum Nachweis von Apoptose detektieren relativ späte Ereignisse. Darüber hinaus sind diese Methoden nur wenig geeignet, Apoptose ex vivo nach Apoptoseinduktion nachzuweisen, da apoptotische Zellen in vivo Veränderungen aufweisen, die mit einer Modifikation in der Zellmembran einhergehen, so daß apoptotische Zellen sehr rasch in vivo vom retikuloendothelialen System eliminiert werden. Das führt dazu, daß apoptotische Zellen für eine ex vivo Detektion dann nicht mehr zur Verfügung stehen. Dies ist ein großer Nachteil, da der Nachweis der Initiierung oder Suppression von Apoptose in vivo immer größere diagnostische Bedeutung erlangt, einerseits um den Zytostatika-induzierten Zelltod zu verfolgen, andererseits um HIV-Erkrankungen oder Neurodegeneration, die gesteigerten Zellumsatz und Zelltod durch verstärkte Apoptose hervorrufen, zu erkennen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem zuverlässig das Ausmaß an Apoptose in Zellen abgeschätzt werden kann.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren gemäß Patentanspruch 1 sowie einen Kit gemäß Patentanspruch 5 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Der molekulare Mechanismus durch welchen Antikrebs-Medikamente Apoptose in Zielzellen auslösen ist noch relativ unbekannt. Von den Erfindern wurde in jüngster Zeit gefunden, daß die durch Zytostatika in Tumorzellen induzierte Apoptose die

Aktivierung von Proteasen der ICE/Ced3-Familie erfordert. Nach Gabe des Medikaments wurde ein starkes Ansteigen der ICE-ähnlichen Aktivität gefunden, welche dem Zelltod vorausgeht. Die gefundenen Daten geben zu dem Schluß Anlaß, daß alle Apoptose auslösenden Ereignisse einen gemeinsamen Signalweg betätigen, an dem letztendlich der Zelltod steht. Für die Effektorphase bei intrazellulären Signalwegen, die zu Apoptose führen, ist die Aktivierung der ICE/Ced3-Familie essentiell. Die Aktivierung von ICE-Proteasen geht dem morphologisch messbaren apoptotischen Zelltod und dem Auftreten von DNA-Strangbrüchen um mehrere Stunden voraus und ist somit ein früher Parameter der Apoptose in ansonsten noch intakten Zellen. Somit stellt die Aktivierung von ICE/Ced3-Proteasen ein frühes Ereignis in Zellen dar, in denen irreversibel das Apoptoseprogramm induziert wurde.

Die Erfindung beruht nun auf der Erkenntnis der Erfinder, daß über die verfolgbare Aktivierung der ICE/Ced3-Proteasen auf molekularer Ebene frühe Ereignisse, die mit der Induktion von intrazellulären Apoptoseprogrammen assoziiert sind, detektiert werden können. Vorzugsweise werden ex vivo Proben von Patienten vermessen, die unter einer apoptoseinduzierenden oder apoptoseinhibierenden Therapie stehen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es deshalb möglich, die Bestimmung der Wirkung von Therapien anhand der Induktion bzw. Inhibierung von Apoptose ex vivo oder in vivo an intakten Zellen zuverlässig vorzunehmen.

Zur Durchführung der quantitativen Messung der Induktion des Apoptoseprogramms wird die Aktivierung der ICE/Ced3-Proteasen mittels einer bildgebenden (optischen) Methode, vorzugsweise einer Flow-cytometrischen Methode, detektiert. Zu diesem Zweck werden intakte Zellen nach Permeabilisierung mit Substraten für ICE/Ced3-Proteasen beladen. Die Permeabilisierung kann beispielsweise durch Zugabe von Wasser zu den Zellen (osmotischer Schock) oder durch Einwirkung von Digitonin bzw. anderen Permeabilisatoren erfolgen. Bevorzugt findet die Permeabilisierung soweit statt, daß 10% der Zellen danach als lebend im forward/side-scatter erscheinen. Geeignete Substrate für die ICE/Ced3-Proteasen weisen mindestens eine Aspartylgruppe auf. Die Protease-Substrate sind vorzugsweise zur Durchführung einer Flow-cytometrischen Messung fluorogen. Geeignete

Substrate sind in "Matayoshi et al., Science 247, S. 954-958 (1990)" beschrieben. Vorzugsweise wird ein fluorogenes Substrat verwendet, bei dem 5-[(2-Aminoethyl)amino]naphthalin-1-sulfonsäure (EDANS) den fluorogenen Donor und 4-(4-Dimethylaminophenylazo)-benzoesäure (DABCYL) den quenenchenden Akzeptor darstellt, wobei Donor und Akzeptor miteinander mittels eines Spacers verbunden sind. Ganz besonders bevorzugt werden DABCYL-YVADAPK-EDANS oder DABCYL-DEVDAPK-EDANS verwendet. Ferner können auch Cumarin-verwandte Substrate, wie DEVD-NMA, verwendet werden. Ebenso eignen sich Rhodamin 110-Derivate, bei denen Aminogruppen mit verschiedenen einzelnen Aminosäuren oder kurzen Caspase-Substratpeptiden substituiert sind. Die intrazelluläre Proteaseaktivität wird optisch, vorzugsweise mittels eines Flow-Cytometers, als Fluoreszenz des gespaltenen Substrats gemessen. Gleichzeitig ermöglicht die Methode die Identifikation der Zellen über Oberflächenmarker in der Simultanmessung, d.h. bei verschiedenen Zellen kann exakt bestimmt werden, welche Zellen noch leben und welche abgestorben sind.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind, daß es schnell und unkompliziert durchführbar ist und eine sensitive Detektion ermöglicht. Der Apoptosenachweis ist mehrere Stunden, bevor morphologisch faßbare Veränderungen in den Zellen auftreten, möglich und wird nicht durch die Beseitigung apoptotischer Zellen durch das retikuloendotheliale System in vivo beeinflusst. Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich auch mittels eines Kits durchführen. Dieser enthält ein vorstehendes Substrat für Proteasen der ICE/Ced3-Familie, wobei das Substrat insbesondere fluorogen ist. Ganz besonders bevorzugt sind Substrate, wie DABCYL-YVADAPK-EDANS, DABCYL-DEVDAPK-EDANS, DEVD-NMA oder Rhodamin 110-Derivate, bei denen Aminogruppen mit verschiedenen einzelnen Aminosäuren oder kurzen Caspase-Substratpeptiden substituiert sind.

Die vorliegende Erfindung wird nun anhand der Figuren weiter beschreiben, von denen zeigen:

Fig. 1

2D-Plots der gemessenen ICE/Ced3-Aktivität (x-Achse) gegen

die gemessene Autofluoreszenz bei 660 nm ( $\gamma$ -Achse)

Fig. 2 Auftrag der gemessenen ICE/Ced3-Aktivität in einem Histogramm  
Kontrollzellen : weiß  
nach anti-APO-1-Behandlung : schwarz

Fig. 3 Messung der durch Doxorubicin-induzierten ICE/Ced3-Aktivität und Zelltod (Höchst 33342/Propidiumjodid) in CEM-Zellen in einer Zeitkinetik  
Die ICE/Ced3-Aktivität (Quadrate) kann 2-4 Stunden vor den ersten DNA-Veränderungen, die apoptotischen Zelltod zeigen (Rauten), detektiert werden.

Fig. 4 Messung der Fluoreszenzintensität (Caspasen-Aktivität) und Zellzahl bei Jurkat-Zellen nach Behandlung mit anti-APO-1

Die Erfindung wird nun weiter anhand der folgenden Beispiele beschrieben.

## BEISPIEL 1

### 1. Variante

CEM-Zellen, die für 1 Stunde mit einem für CD95-spezifischen Antikörper (anti-APO-1; 1  $\mu$ g/ml) behandelt worden sind (vgl. Oehm, A. et al., The Journal of Biological Chemistry, Band 267, Nr. 15 (1992), S. 10709-10715), werden in Zellkulturmedium RPMI1640 + 10% FCS kultiviert. Es werden 10  $\mu$ l ICE/Ced3-Substrat DABCYL-YVADAP-EDANS (Stocklösung 100 mM in DMSO; aufbewahrt bei -70°C) zugegeben. Es erfolgt die Zugabe von Wasser (gleiches Volumen wie das Zellkulturmedium) zur Permeabilisierung der Zellen. Die Mischung wird für 5 Minuten bei 37°C inkubiert bevor eiskaltes 5x PBS in 50% FCS (0,25 Volumen des Anfangsvolumens) zugegeben wird, um die Osmolarität auf den normalen Wert zu bringen. Die Mischung wird auf Eis aufbewahrt und innerhalb von 2 Stunden im

Flow-Cytometer vermessen. Die Anregungswellenlänge des verwendeten Substrats beträgt ~ 360 nm und die Emission wird bei 488 nm gemessen.

Als Kontrolle werden unbehandelte CEM-Zellen dem gleichen Prozedere unterworfen.

## 2. Variante

CEM-Zellen, die für 2 Stunden mit einem für CD95-spezifischen agonistischen Antikörper (anti-APO-1; 1 µg/ml) behandelt worden sind (vgl. Oehm, A. et al., The Journal of Biological Chemistry, Band 267, Nr. 15 (1992), S. 10709-10715), werden in Zellkulturmedium (RPMI1640 + 10% FCS) kultiviert. Es werden 10 µl ICE/Ced3-Substrat DABCYL-YVADAP-EDANS (Stocklösung 100 mM in DMSO; aufbewahrt bei -70°C) und Digitonin in einer Endkonzentration von 0,002-0,005% (bevorzugte Konzentration: 10% der Zellen erscheinen nach Permeabilisierung als lebend im forward/side-scatter) zugegeben. Die Mischung wird 5 Minuten bei 37°C inkubiert bevor ein gleiches Volumen eiskaltes Zellkulturmedium oder PBS zugegeben wird, um das Digitonin zu verdünnen. Die Mischung wird auf Eis aufbewahrt und innerhalb von 2 Stunden im Flow-Cytometer vermessen. Die Anregungswellenlänge des verwendeten Substrats beträgt ~ 360 nm und die Emission wird bei 488 nm gemessen.

Als Kontrolle werden unbehandelte CEM-Zellen dem gleichen Prozedere unterworfen.

Es ist anzumerken, daß die Variante 2 effektiver ist, allerdings liefern die nach Variante 1 behandelten Zellen einen niedrigeren Hintergrund.

Die Ergebnisse sind in den Figuren 1 und 2 gezeigt. Daraus ist klar ersichtlich, daß die behandelten Zellen eine deutliche ICE/Ced3-Aktivität zeigen, während die Aktivität bei den unbehandelten Zellen vernachlässigbar gering ist.

**BEISPIEL 2**

CEM-Zellen, die mit Doxorubicin ( $1\mu\text{g/ml}$ ) behandelt worden sind, werden in Zellkulturmedium (RPMI1640 + 10% FCS) kultiviert. Es werden  $10\mu\text{l}$  ICE/Ced3-Substrat DABCYL-YVADAP-EDANS (Stocklösung 100 mM in DMSO; aufbewahrt bei  $-70^\circ\text{C}$ ) und Digitonin in einer Endkonzentration von 0,002-0,005% (bevorzugte Konzentration: 10% der Zellen erscheinen nach Permeabilisierung als lebend im forward/side-scatter) zugegeben. Die Mischung wird 5 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert bevor ein gleiches Volumen eiskaltes Zellkulturmedium oder PBS zugegeben wird, um das Digitonin zu verdünnen. Die Mischung wird auf Eis aufbewahrt und innerhalb von 2 Stunden im Flow-Cytometer vermessen. Die Anregungswellenlänge des verwendeten Substrats beträgt  $\sim 360\text{ nm}$  und die Emission wird bei  $488\text{ nm}$  gemessen.

Die aufgenommene Zeitkinetik ist in Fig. 3 gezeigt. Daraus ist ersichtlich, daß die ICE/Ced3-Aktivität lange vor Eintritt des Zelltodes nachweisbar ist und ein sicheres Indiz für begonnene Apoptose liefert.

**BEISPIEL 3**

Jurkat-Zellen werden 1,5 h mit einem für CD95-spezifischen Antikörper (anti-APO-1) behandelt. Sie werden dann behandelt, wie in der Variante 1 von Beispiel 1 beschrieben. Als ICE/Ced3-Substrat wird das Caspasen-Substrat  $\text{D}_2$ Rhodamin bis zu einer Endkonzentration von  $50\mu\text{M}$  zugegeben. Die Caspase-Aktivität wird in einem Flow-Cytometer (FACScan, Becton Dickinson) gemessen. Die Anregungswellenlänge beträgt  $488\text{ nm}$ . Die Fluoreszenz wird im FL1-Photomultiplier gemessen. Die punktierte Linie zeigt die Kontrollzellen, die nicht mit dem anti-CD95-Antikörper behandelt wurden. Die durchgezogene Linie zeigt die Fluoreszenzverschiebung nach Antikörper-Behandlung. Durch Propidiumiodid-Färbung läßt sich erst 3 h nach Antikörper-Behandlung eine Zunahme von toten Zellen nachweisen.

Als Kontrolle werden unbehandelte Jurkat-Zellen dem gleichen Prozedere unter-

worfen.

Das Ergebnis ist in Fig. 4 gezeigt. Daraus ist ersichtlich, daß bei den behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen eine Fluoreszenzverschiebung auftritt, was die unterschiedliche ICE/Ced3-Aktivität wiedergibt.

### Patentansprüche

- 1) Verfahren zum Nachweis von Apoptose in Zellen, wobei die Zellen mit einem Substrat für Proteasen der ICE/Ced3-Familie beladen werden und die Umsetzung des Substrats durch die Protease mittels bildgebender Methoden verfolgt wird.
- 2) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat ein fluorogenes Substrat ist.
- 3) Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat DABCYL-YVADAPK-EDANS, DABCYL-DEVDAPK-EDANS, DEVD-NMA oder ein Rhodamin 110-Derivat, bei dem Aminogruppen mit verschiedenen einzelnen Aminosäuren oder kurzen Caspase-Substratpeptiden substituiert sind, ist.
- 4) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung optisch mittels Flow-Cytometrie verfolgt wird.
- 5) Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4, enthaltend ein Substrat für Proteasen der ICE/Ced3-Familie.
- 6) Kit nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat fluorogen ist.
- 7) Kit nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat DABCYL-YVADAPK-EDANS, DABCYL-DEVDAPK-EDANS, DEVD-NMA oder ein Rhodamin 110-Derivat, bei dem Aminogruppen mit verschiedenen einzelnen Aminosäuren oder kurzen Caspase-Substratpeptiden substituiert sind, ist.

1/4

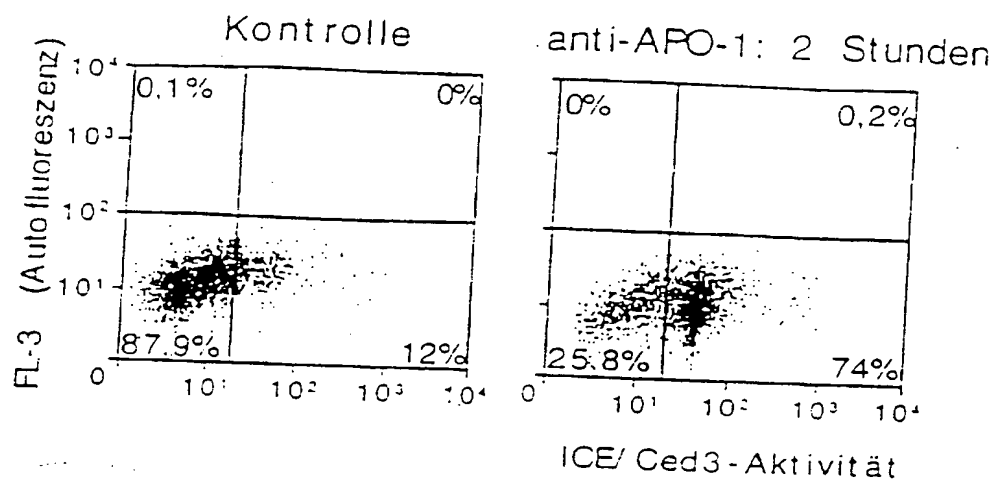
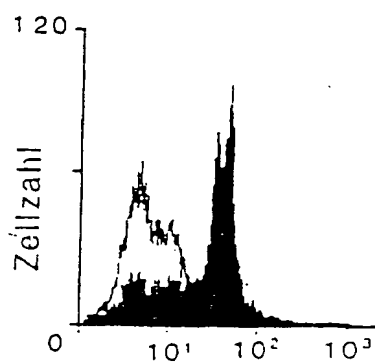


FIG. 1

2/4



ICE/Ced3-Aktivität

FIG. 2

3/4

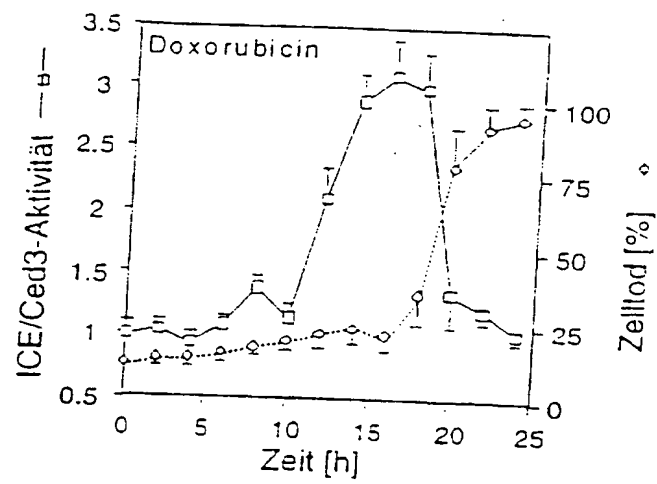


FIG. 3

4/4

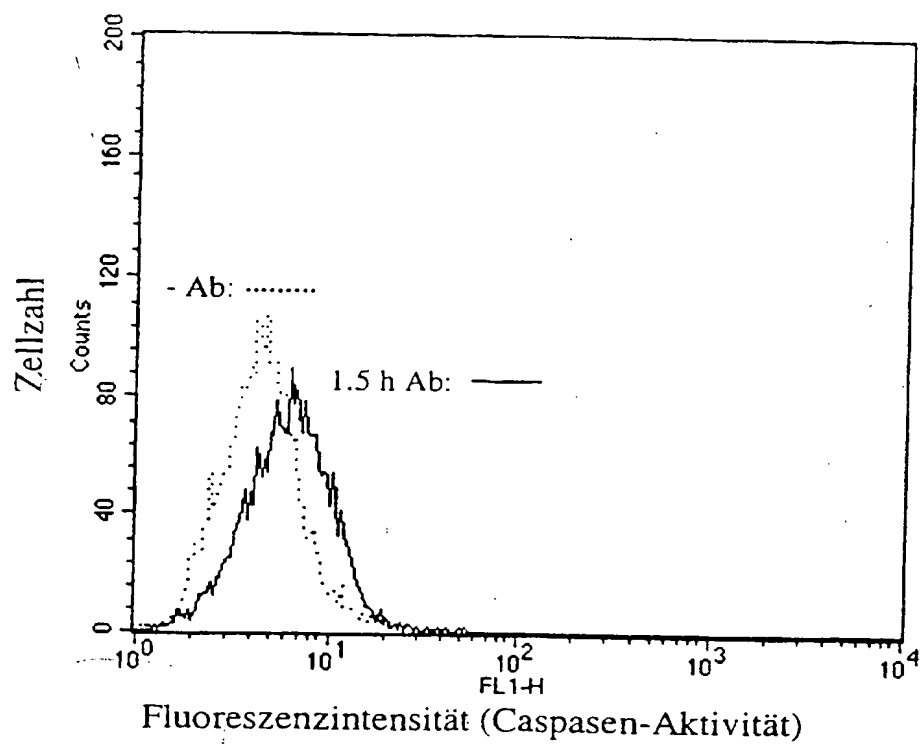


FIG. 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 97/02204

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 34576 A (PANORAMA RESEARCH, INC.) 21 December 1995 see page 1 - page 3, line 26; example 7	1-7
Y	V. GAGLIARDINI ET AL.: "Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene." SCIENCE, vol. 263, 11 February 1994, LANCASTER, PA US, pages 826-828, XP002056344 see the whole document	1-7
Y	WO 93 25694 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 23 December 1993 see abstract	1-7

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 1998

Date of mailing of the international search report

06/03/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/DE 97/02204

**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	E. D. MATAYOSHI ET AL.: "Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer." SCIENCE, vol. 247, 23 February 1990, LANCASTER, PA US, pages 954-958, XP002056345 cited in the application see the whole document ---	1-7
Y	EP 0 428 000 A (ABBOTT LABORATORIES) 22 May 1991 see the whole document ---	1-7
Y	WO 96 13607 A (ONCOIMMUNIN, INC.) 9 May 1996 see abstract: claims -----	1-7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/02204

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9534576 A	21-12-95	US 5605826 A AU 2697595 A EP 0767799 A	25-02-97 05-01-96 16-04-97
WO 9325694 A	23-12-93	EP 0672151 A JP 8500482 T WO 9325685 A	20-09-95 23-01-96 23-12-93
EP 428000 A	22-05-91	CA 2029123 A JP 3172196 A JP 6061279 B	04-05-91 25-07-91 17-08-94
WO 9613607 A	09-05-96	US 5605809 A AU 3897495 A US 5714342 A	25-02-97 23-05-96 03-02-98

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/02204

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12Q1/37

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12Q C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 95 34576 A (PANORAMA RESEARCH, INC.) 21. Dezember 1995 siehe Seite 1 - Seite 3, Zeile 26; Beispiel 7	1-7
Y	V. GAGLIARDINI ET AL.: "Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene." SCIENCE., Bd. 263, 11. Februar 1994, LANCASTER, PA US, Seiten 826-828, XP002056344 siehe das ganze Dokument	1-7
Y	WO 93 25694 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 23. Dezember 1993 siehe Zusammenfassung	1-7

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Februar 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06/03/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Griffith, G

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int.ionales Aktenzeichen

PCT/DE 97/02204

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	E. D. MATAYOSHI ET AL.: "Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer." SCIENCE., Bd. 247, 23.Februar 1990, LANCASTER, PA US, Seiten 954-958, XP002056345 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-7
Y	EP 0 428 000 A (ABBOTT LABORATORIES) 22.Mai 1991 siehe das ganze Dokument ---	1-7
Y	WO 96 13607 A (ONCOIMMUNIN, INC.) 9.Mai 1996 siehe Zusammenfassung; Ansprüche -----	1-7

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören:

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/02204

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9534576 A	21-12-95	US 5605826 A	25-02-97
		AU 2697595 A	05-01-96
		EP 0767799 A	16-04-97
WO 9325694 A	23-12-93	EP 0672151 A	20-09-95
		JP 8500482 T	23-01-96
		WO 9325685 A	23-12-93
EP 428000 A	22-05-91	CA 2029123 A	04-05-91
		JP 3172196 A	25-07-91
		JP 6061279 B	17-08-94
WO 9613607 A	09-05-96	US 5605809 A	25-02-97
		AU 3897495 A	23-05-96
		US 5714342 A	03-02-98